

日本神経化学会優秀賞受賞者研究紹介

遺伝子改変を駆使したグリア研究の推進

Promotion of glial cell research by virtue of transgenic approach

田中 謙二

(慶應義塾大学医学部精神・神経科学教室 情動の制御と治療学研究寄附講座 特任准教授)

はじめに

グリア細胞の複雑な形、ダイナミックな応答を目の当たりにした多くの研究者がグリア研究に魅せられ参入してきている。こんなにもダイナミックな細胞がただのノリであるはずがないという信念で研究を続けている私を含むグリア研究者は、グリア細胞の機能は何か、グリア細胞が神経回路修飾をどのように行っているのか、グリア細胞が脳の高次機能を本当に支えているのかというグリア研究の根本的な問いを解こうと日々努力している。

グリアを知るための研究はなるべく *in vivo* に近い状態で行うことが望ましい。*In vivo* で、グリア細胞だけから情報を抽出する、グリア細胞の状態だけを操作するには、外傷を伴わずに情報をレポートするためのプローブ分子、操作を可能にするアクチュエーター分子（これらを機能分子と呼ぶ）を忍ばせる必要がある。

グリア細胞に機能分子を「十分に」発現させるにはどうすればよいのか。この10年の研究の積み重ねで、いわゆる細胞種特異的プロモーターを単に連結しただけのコンストラクトでは、機能分子を機能するに十分な量だけ発現させることが困難であることが分かってきた。グリア研究を推進させるためには、これらの機能分子を十分に発現させる困難に打ち克ち、誰かが成功しなければならぬ。私は遺伝子改変を駆使した発現方法を改良し、これを様々な細胞種で確立した。

操作のための機能分子を発現させた後にどのよ

うな研究を展開すればよいのか、観察のための機能分子を発現させた後にどのような研究を展開すればよいのか。グリア研究全体の進歩にこれらの技術をどのように浸透させればよいのか、グリア研究だけでなく神経化学全般にたいして遺伝子改変の高い技術を広めるにはどうしたらよいのか。遺伝子改変技術を得意とする私の考えるグリア研究の今後のあり方を述べてみたい。

私を驚かせたグリアの形、グリアの応答

私は美しい写真を教材にしてグリアの形態学を学んだ。生理学研究所名誉教授の濱清先生の電子顕微鏡写真を教材に、濱先生ご自身から講義を受けた。図1は、写真の中心にあるシナプスをアストロサイトが取り囲む様子を示している。アストロサイトの突起がかくも薄いものなのかと驚かされたと同時に、神経とグリアを分けて観察する、操作するには特別の工夫が必要であると痛感した。

次に驚いたのがニューヨーク大学の Wenbiao Gan によるミクログリアの *in vivo* 形態観察である¹⁾。2005年の *Nature Neuroscience* 誌に発表された動画をご覧になった方は多くいると思われる。外傷に伴うミクログリアの動きを二光子顕微鏡で観察した報告であるが、外傷に伴うグリアの活性化を静止画の組織染色像だけで理解していた私にとって衝撃的であった。実験手技にともなう外傷がグリア細胞の形態と機能を大きく変えるというグリア研究者へのメッセージとしても受け止められた。

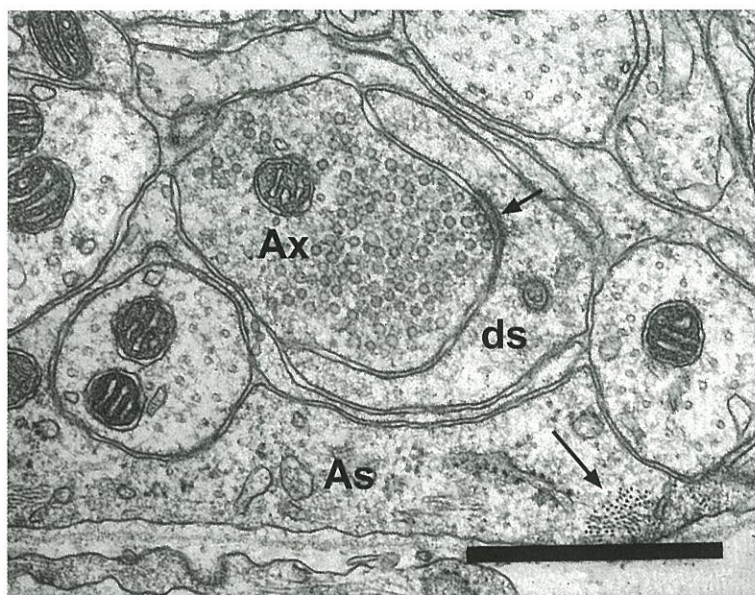


図1 アストロサイトの微細形態

シナプス前部 (Ax: axon terminal)、シナプス後部 (ds: dendritic spine) が写真中心にある。小矢印はシナプス後肥厚を示す。シナプス構造の下に位置する細胞は、中間径フィラメント (大矢印, glial fibrillary acidic protein) の存在からアストロサイト (As) と同定できる。アストロサイトの細胞質を右から左においかけて、上までいくと、次は左から右へ折り返す。途中シナプス間隙を覆う。この折り返しの厚さは数十ナノメートルである。興味深いことに、シナプス間隙あたりに、小胞が3つ存在する。グリオトランスミッターを詰め込んでいるのだろうか。ラット大脳皮質。スケール=1 μ m。濱清先生のご厚意による。2010年度 微細形態勉強会テキスト (非売品) より。濱清先生の許可を得て引用。

グリア細胞の役割を知る

グリア細胞の in vivo での役割を知るために、これを行えば良いというような答えはない。私達は、既に誰かが明らかにした役割を確認するのではなく、誰も知らない役割を明らかにしたいと目論んでいるので、研究方法そのものにも独創性が必要になってくる。とはいえ、研究方法の大枠は、in vivo になるべく近い状態での「観察」と「操作」である。では、何を観察して、何を操作すればよいのか。

この問題は後ほど議論することにして、まずは観察と操作を行うための下準備について、皆さんと共通の認識を持ちたい。たとえばグリア細胞の形を観察するには GFP: green fluorescent pro-

tein を発現させればよい。グリア細胞内のカルシウム濃度変化を観察するにはカルシウムインジケーターを発現させればよい。グリア細胞を脱分極させなければ光駆動型チャネルを発現させればよい。観察するための機能分子、操作するための機能分子は次々と開発されているので、自分の研究目的に合った機能分子を選べばよい。では、それらの機能分子をどうやってグリア細胞だけに発現させるのか。

グリア特異的のプロモーターを用いて機能分子を発現させれば良い。正解である。どれくらい発現させれば良いのだろうか。これが大問題である。

機能分子をどれくらい発現させれば良いのか

たとえば GFP : green fluorescent protein を発現させることを考えて欲しい。GFP という蛍光を発する蛋白質を発現させることを目的としているのか、免疫染色のためのエピトープを発現させることを目的としているのかで、どの程度の発現量を要求しているのか異なってくる。前者であれば、蛍光を検出できる発現量があれば研究者は満足でき、後者であれば直接蛍光が全く観察できなくても、免疫染色によって間接蛍光を捉えられれば満足できる。前者の方が高い発現量が要求され、後者であればわずかな発現量で良い。さらに前者のうち、励起効率の悪い二光子顕微鏡での *in vivo* 観察を目的としていけば、一光子のいわゆる蛍光顕微鏡で蛍光が見られるレベルよりも更に高い発現量を要求される。このように、機能分子を発現させると一言に言っても、目的によってゴールが全く異なる。

光駆動型チャネル (チャネルロドプシン、ChR2 : channelrhodopsin 2) を発現させる場合はどうであろうか。この場合の目的は、「光電流を惹起できるだけの発現量を得ること」になる。明快である。では具体的にどれくらい強いプロモーターを使えばよいのか。これは試行錯誤の末の経験によって分かってくるものである。自らの経験で分かったことは、光電流を惹起できる量の ChR2 を発現させるための力と、直接蛍光を観察できる量の GFP を発現させる力が全く違うという点である。現在、多くの場合、ChR2 を GFP との融合遺伝子として発現させている。同じモル数のそれぞれの mRNA を発現できた場合、結果として得られる ChR2-GFP の直接蛍光と GFP 単独の直接蛍光の比はざっと見積もって 1 : 10 ほどもある (ChR2-GFP のほうが断然暗い)。ChR2 は 7 回膜貫通の膜蛋白であるので、折りたたみ、膜への挿入、細胞表面への移動といくつもの関門をのりこえて初めて機能分子が完成するためである。経験的に、ChR2-GFP の直接蛍光を検出できなければ、光電流が得られないことが分かっている。一方で直接蛍光が検出できないが GFP 染色で

ChR2-GFP の発現を確認できる場合がある。確かに発現させることに成功している。しかし実験の目的が光電流を得ることであるので、そのような場合は準備のやり直しになる。遺伝子改変マウスであればそのマウスは安楽死させることになる。

繰り返すが、機能分子は機能してはじめて意味がある。機能するために必要な発現量は経験によって分かってくるものである。とりあえず新たな機能分子を発現させる場合は、できるだけ多く発現させるという戦略をとることになろう。発現させすぎて困ることはないのだろうか。それについては後述する。

一番大事なのは発現量。では細胞種特異的発現にこだわる必要はあるのか？

一般的に、高い発現量と細胞種特異的発現を同時に達成することは難しい。一番避けなければならないのは、細胞種特異的発現にこだわったために発現量が下がり機能を発揮できないことである。ChR2 に言い換えれば、アストロサイトに発現させることに成功はしたが、光電流を惹起できなかったというケースである。では細胞種特異的な発現を諦めてしまっても良いのだろうか？ グリア研究では否である。

先ほど紹介したアストロサイトの突起 (図 1) を想像していただきたい。厚さ数十ナノメートルの木の葉のような薄い突起である。この周囲には、神経細胞の成分、他のグリアの成分が入り交じり、脳実質を埋め尽くしている。

この現実を知ってしまうと、細胞種特異的な発現が担保されない状態でグリアと神経を分けて操作し、グリアと神経を分けて観察しましたと主張されても全く納得がいかない。二光子で励起部位を限局し共焦点顕微鏡で観察部分を限局しても、曖昧さが残る。光学系の限界を、細胞種特異的な遺伝子発現で補うのが筋だろう。

細胞種特異的に高い発現量を得るには？

遺伝子改変のみの技術でこの両方の要求を満た

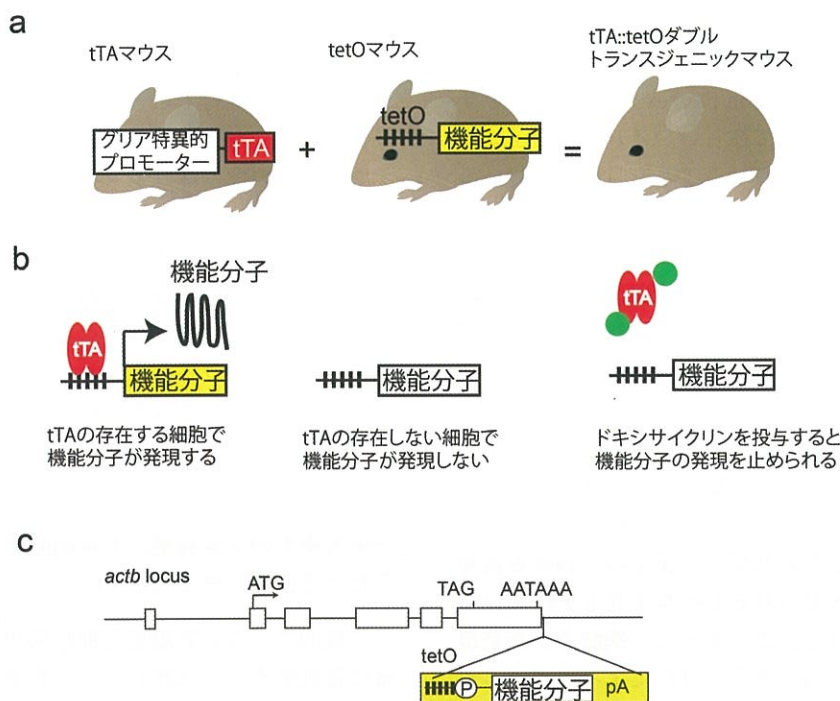


図2 Tet システムと KENGE-tet

a) Tet システム

Tet システムは tTA マウスと tetO マウスを交配させ、得られるダブルトランスジェニックマウスを用いる。tTA マウスでは、tTA (tetracycline transactivator, 転写誘導蛋白質) がグリア特異的に発現する。tetO マウスでは tetO プロモーターの下流に機能分子 cDNA がつないである。

b) 細胞種特異的な機能分子の発現

tTA の存在する細胞だけで機能分子が発現する (左) が、tTA の存在しない細胞では機能分子は発現しない (中央)。機能分子の発現量が高すぎて毒性が見られる場合にはドキシサイクリン (緑丸) の投与で発現量を下げられる (右)。

c) KENGE-tet

tetO-機能分子 cDNA カセットが、 β -actin 遺伝子 (*actb*) の polyA シグナル (AATAAA) の下流にノックインしてある。これにより十分量の機能分子の発現が期待できる。ATG: 翻訳開始部位。TAG: 翻訳停止部位。

す方法には2つの方法がある。一つは Cre-loxP システムを改良した方法で、Allen Institute の Hongkui Zeng が作成した Ai⁽²³⁾、もう一つは tet システム (図 2a, b) を改良した方法で、筆者らが作成した KENGE-tet⁽⁴⁾ (図 2c) である。それぞれ2つのマウスを交配して得られるダブルトランスジェニックマウスを用いる。

1つめのマウスは細胞種特異性を担保するためのマウス (tTA マウス) で、もう一つのマウスは高い発現量を得るためのマウス (tetO マウス) で

ある。私は tetO マウスに改良を加えて機能分子の高い発現量の確保を実現した。

KENGE-tet (Knockin-mediated ENhanced Gene Expression)

脳研究に Cre-loxP システムが登場したのも、tet システムが登場したのも 1996 年のことである⁵⁾。しかし、世の中では Cre-loxP システムが圧倒的に普及している。何故だろうか? いくつか理由

が考えられるが、私個人の意見としては、tet システムでは tTA が発現しているにもかかわらず tetO 以下の遺伝子の発現が全く得られないことが多々あるからである⁶⁾。今現在でも、何故失敗するかについて明確な答えは得られていないが、どうすれば上手くいき、どうすると高率に失敗するか経験的にわかってきた。結論から言うと、tetO を house keeping gene、たとえば β -actin 遺伝子の近傍にノックインすると上手くいき、tetO をランダムにトランスジーンすると失敗する。

細胞種特異的 tTA マウスとしては、アストロサイト (*Mlc1*-tTA)⁴⁾、オリゴデンドロサイト (*Plp1*-tTA)⁷⁾、ミクログリア (*Aif1*-tTA)⁴⁾ にそれぞれ特異的なマウスがいる。NG2 陽性細胞をターゲット出来る tTA マウスはまだ報告がない。

これらの tTA マウスと交配できる KENGE-tetO マウスは 5 つある。ChR2 (C128S) 変異体⁴⁾、ChR2 (E123T/T159C) 変異体⁸⁾、ArchT⁹⁾、yellow cameleon nano50¹⁰⁾、GCaMP6 (論文未発表) をそれぞれ発現誘導できる。前半 3 つの分子はグリア細胞の機能を操作するための機能分子で、後半 2 つの分子はグリア細胞内カルシウム濃度を測定するための機能分子である。

tTA 3 種、tetO 5 種から理論上は 15 種類の組み合わせが得られる。そのすべてで機能解析を行ったわけではないが、アストロサイトの ChR2、ArchT、オリゴデンドロサイトの ChR2、ArchT、ミクログリアの ChR2 の 5 パターンについては、光電流を惹起できる十分な発現量を得られた。また、グリア 3 種の細胞内カルシウムを計測するに十分な yellow cameleon の発現も得られた。

tetO カセットを house keeping gene の近傍にノックインすることが tet システムで思い通りの発現を得るポイントである。私が用いる β -actin 遺伝子座以外にも 2 つの成功例があることを紹介する。1 つは、Colla1 遺伝子座¹¹⁾、もう 1 つが TIGRE 遺伝子座¹²⁾である。Colla1 遺伝子座に tetO カセットをノックインしたマウスでは、特に幹細胞研究において実績をもつ^{13)~15)}。TIGRE 遺伝子座は前述した Hongkui Zeng が発見した遺伝子座で、論文¹⁶⁾を見る限り有力な遺伝子座と言えよ

う。

Tet システムが Cre-loxP システムに勝る点の一つある。機能分子を発現させすぎたときに、その発現を弱めることが出来る点である。機能分子の発現における大前提は、「発現量が命」であるが、発現させすぎると凝集体を形成し細胞体を傷害することがある。このようなときに、発現量を減らすことができるのが tet システムの強みである。テトラサイクリンアナログのドキシサイクリンを経口投与させると、tet システムが作動しなくなり、機能分子の発現量を抑えることが出来る (図 2b)。

何を観察するか

グリア細胞特異的に機能分子を十分に発現できるようになった今、グリア細胞の何を観察すればよいだろうか。神経細胞であれば、まず見るべきものは活動電位である。神経活動電位が神経活動の一単位 (ユニット) として確立しているからである。神経活動電位に匹敵するアストロサイトの活動の単位は何であろうか。細胞内カルシウム濃度変化はその一つの候補とみなされている。ただしアストロサイト細胞内カルシウムが観察しやすいから観察しているだけという否定的なとらえ方も出来る。さまざまなプローブ分子が開発されているが、培養アストロサイトでの妥当性の検討を経て in vivo アストロサイトへの使用に進んでいるケースはカルシウムセンサー以外ほとんど存在しないのも事実である。

得られた結果は脳活動を理解する上で重要な示唆を与えているのであろうか。In vivo アストロサイト細胞内カルシウム濃度測定と他の生理学実験を組み合わせ、アストロサイトの細胞内カルシウム濃度変化が行動¹⁷⁾や神経活動¹⁸⁾、血管活動¹⁹⁾とリンクしているかのような研究が多くある。これらをすべてぶち壊す研究報告として、アストロサイト小胞体からのカルシウム放出が全くないマウス (IP3 受容体 2 型ノックアウトマウス) を用いた結果がある。このマウスでは行動の異常が観察されない²⁰⁾、神経活動も正常に行われている²¹⁾。

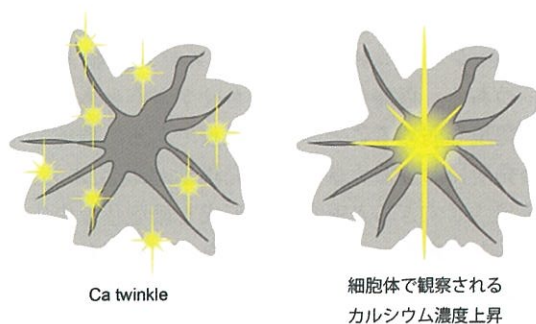


図3 Ca twinkle

細胞体で観察されるカルシウム濃度上昇（右）は、比較的観察しやすく、これまで多くの研究での観察対象となってきた。突起で観察されるカルシウム濃度上昇（左）は、高い感度のカルシウムインジケーターでのみ観察することができる。星がまたたくイメージからCa twinkleと命名した。Ca twinkleがどのような情報を運んでいるか明らかにすることが今後の課題である。

この乖離をどう捉えればよいのだろうか。片やアストロサイト細胞内カルシウム濃度変化が大事だと主張し、片や濃度変化を消失させても何ら問題がないと主張している。この乖離の原因の一つとして、私達は、アストロサイト細胞内カルシウム濃度変化を十分に捉えられていないので、見落としがあるだろうと着想した。In vivo カルシウムイメージングでは、細胞体でのカルシウム濃度上昇について調べているものがほとんどで、突起で発生するカルシウム濃度変化を捉えられていない。というのも、突起で発生する微弱なカルシウム濃度変化をin vivoで観察する方法が無かったからである。細胞内カルシウム濃度は数十nMと考えられているので、突起で生じる微妙な変化を捉えるにはこの濃度に対応した高感度のカルシウムインジケーターを用いなければならない。そしてIn vivo イメージングでは、拍動や血流などの動きに起因するノイズのなかから微弱な信号を検出しなければならない。

私達（東京大学 飯野正光博士、金丸和典博士、関谷敬博士との共同研究）は、アストロサイトの突起で発生するカルシウム上昇を捉えることを目的として、yellow cameleon nano50⁽²²⁾という高感度のカルシウムインジケーターを採用した。カルシ

ウムとのKd値が50nMであること、CFPとYFPの蛍光値の割り算によってカルシウム濃度を算出するために体動によるノイズを低減できることの2点の長所が採用理由である。「機能分子は発現量が命」であるので、KENGE-tetシステムを用いて、yellow cameleon nano50を十分に、アストロサイトだけに発現させた。実際のin vivo イメージングでは、CFPを二光子励起するに十分な量のカルシウムインジケーターを突起の先端に発現できていることがわかった。

麻酔下での観察ではあるものの、

- ・細胞体よりも突起でカルシウム濃度上昇が多く観察される（全ケースの80%程度が突起に局限したカルシウム上昇）
- ・数十秒にわたるカルシウム上昇（ $t_{0.5}$ が40秒）
- ・このシグナルをCa twinkleと命名（図3）
- ・IP3受容体2型ノックアウトマウスでもCa twinkleが観察される

以上が明らかになった⁽¹⁰⁾。Ca twinkleはこれまでのin vivo イメージングでは見逃されていた信号といえよう。

従来の観察対象になっていた細胞体でのカルシウム濃度上昇については、感覚刺激の入力で観察でき、これがIP3受容体2型ノックアウトマウスで消失することを私達の実験系でも確認した。

今後行うべきことは、Ca twinkleの役割を明らかにすることである。まずはCa twinkleとどのような生理現象が、どのような時間経過でリンクするのか調べ直すことになろう。これによって、Ca twinkleに信号としての意味があるのか、アストロサイト活動の一単位として役割があるのかなどを問うことが出来るようになるであろう。またIP3受容体2型ノックアウトマウス研究からの批判をCa twinkleに注目した研究でかわせるかもしれない。しかし、観察できる対象が細胞の中心から末梢にひろがっただけで、アストロサイト細胞内カルシウム濃度変化にはあまり意味のある信号がのっていないという結論に終わるかも知れない。現時点としては、これまで捉えることの出来なかった信号、Ca twinkleの観察実験から、なにか意味のある現象を発見したいとポジティブに考

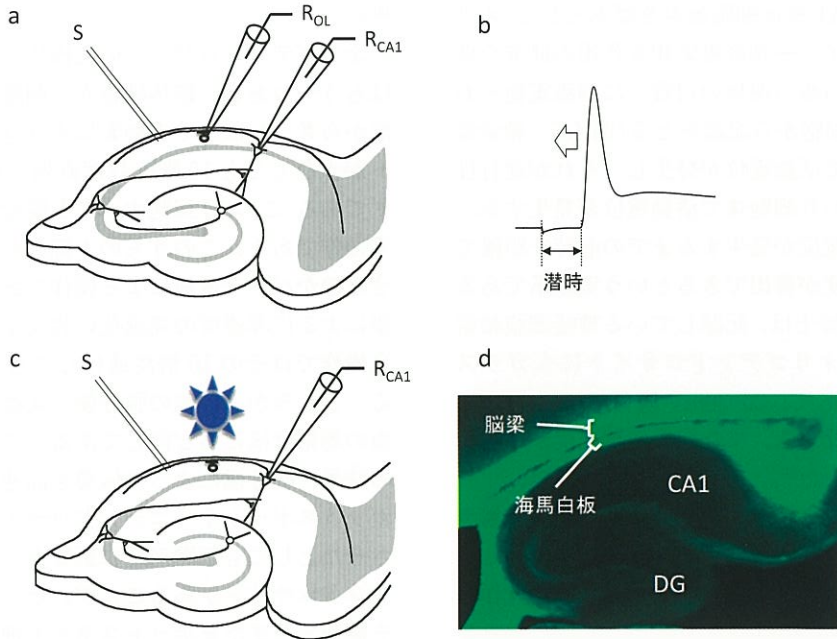


図4 オリゴデンドロサイトの操作

- a) パッチ電極を用いたオリゴデンドロサイトの操作。
海馬白板に刺激電極 (S) をおき、海馬 CA1 錐体細胞から記録をとる (R_{CA1})。記録した CA1 錐体細胞軸索を巻くオリゴデンドロサイトをパッチクランプする (R_{OL})。電流を注入してオリゴデンドロサイトを脱分極させる。
- b) 電気刺激後、CA1 錐体細胞で活動電位が生じるまでの潜時を記録する
- c) オリゴデンドロサイトに ChR2-EYFP が発現するマウスから海馬スライスを調整し、潜時を測定する。光照射でオリゴデンドロサイトに脱分極を起こさせる。
- d) Plp1-tTA::tetO-ChR2EYFP マウスから調整した海馬スライス。YFP 蛍光写真。脳梁と海馬白板はいずれも白質で、緑色が強い。DG：歯状回。

えている。

またミクログリアの細胞内カルシウムやオリゴデンドロサイトの細胞内カルシウムの *in vivo* イメージングも可能である (関谷敬, 未発表データ)。これらのグリア細胞における細胞内カルシウム濃度変化について、ほとんど何も分かっていないので、宝の山の観察対象と言える。

何を操作するか

操作は観察結果から着想すべきである。操作ツールがあるからとりあえず操作をしてみるという研究態度もあるかもしれないが、操作による振動がどのような生理学的意義を持つか答えられな

い研究の価値は低く評価される。私達はオリゴデンドロサイトに光駆動性チャネル ChR2 を発現し、オリゴデンドロサイトを脱分極させた。どのような観察結果に基づく操作で、その意図は何であろうか。

神経軸索に髄鞘を形成するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトは、神経活動の亢進にともなって 10–30mV 脱分極する²³⁾。これは神経からオリゴデンドロサイトへの一方向性の作用と言える。神経活動に由来するオリゴデンドロサイトの脱分極ののちに、オリゴデンドロサイトから神経細胞へ何らかの作用を返していないだろうか。このような疑問で研究をスタートさせたのが山形大学の山崎良彦博士である²³⁾。山崎博士は、有髄線維

である海馬 CA1 錐体細胞軸索を標本として、オリゴデンドロサイトー神経軸索相互作用の研究を開始した。海馬白板（海馬の白質）に刺激電極をおき、海馬錐体細胞から記録をとる（図 4a）。軸索電気刺激によって活動電位が発生し、それが逆行性に軸索をつたわり細胞体で活動電位が発生する。細胞体で活動電位が発生するまでの潜時を距離で割れば伝導速度が算出できるという実験系である（図 4b）。山崎博士は、記録している神経細胞軸索を巻いているオリゴデンドロサイトにもガラスパッチ電極をあて、20-30mV 脱分極させたところ、潜時が短縮する、すなわち伝導速度が増加する現象を発見した²³⁾。

パッチ電極でオリゴデンドロサイトを脱分極させるのではなく、ChR2 と光刺激の組み合わせでオリゴデンドロサイトを脱分極させるのが操作のねらいである（図 4c, d）。そしてオリゴデンドロサイトの脱分極は、神経細胞からオリゴデンドロサイトへの作用を模倣する摂動と位置づけられる。神経細胞とペアをなすオリゴデンドロサイトをパッチ電極で操作することは高い技術があったとしても偶然性と戦わなければならないこと、in vivo 実験への応用が難しいことから光遺伝学的介入が求められていた。そこに私が参入した²⁴⁾。

ChR2 を用いたオリゴデンドロサイトの脱分極（15mV、5-10 分間程度）は、2 つの変化をもたらした。一つは、脱分極の期間、神経伝導速度が増加する変化であり、もう一つは、脱分極の開始から 2 時間以上にわたって神経軸索が発火しやすくなる変化である。前者については、パッチ電極を用いたオリゴデンドロサイトの脱分極操作によって発見した事実の追試であるが、後者については光操作によってはじめて明らかになった。2 時間以上にわたる軸索の興奮性変化は、神経伝導における長期可塑性と位置づけられないだろうか。長期可塑性と言えばシナプス伝達の可塑性を思い浮かべるであろう。そのアナロジーからいくつか検討したものの、シナプス伝達可塑性と異なり、神経伝導の可塑性は新規蛋白質合成を伴わない。スパインの形態変化に相当するなんらかの構造変化があると想像されるがその手がかりは今のところ

無い。

オリゴデンドロサイトの光操作で分かったことはもう一つある。錐体細胞から刺激部位までの距離から考えれば、その軸索にオリゴデンドロサイトが少なくとも 10 細胞程度直列に並んでいるはずである。この 10 細胞すべてを脱分極させるのが光操作であり、このうちの 1 細胞だけを脱分極させるのがパッチ電極による操作である。パッチ電極による伝導速度の高速化の程度を 1 とすると、光操作ではその 10 倍高速化しても良さそうである。ところが 1 細胞の脱分極と光操作による脱分極の効果はほとんど同じである。これまでの検討の結果、脱分極によって伝導を高速化させられるホットスポットオリゴデンドロサイトと、脱分極させたとしても伝導速度に影響を与えないオリゴデンドロサイトがあることがわかってきた。パッチ電極でたまたまホットスポット細胞を操作していたことになる。ホットスポット細胞の局在、性質についてはもう少しデータを重ねてから発表したい。

この小項目では山崎博士と共同で進めている ChR2 を用いたオリゴデンドロサイトの光操作の進捗について述べた。オリゴデンドロサイトは髄鞘を形成する細胞である、髄鞘は跳躍伝導を可能にする構造物である、という 2 点は紛れもない事実である。しかし、この事実は、「オリゴデンドロサイトは伝導の高速化を可能にしたらおしまい」、という思考停止をもたらしてはいないか。我々の操作研究から、オリゴデンドロサイトは神経活動を感知して伝導速度をわずかに変化させたり軸索の興奮性を変えたりする動的な細胞であり、神経伝導の可塑性に関与している可能性があることを指摘したい。

おわりに：操作と観察の両輪を走らせるグリア研究の展開

遺伝子改変技術の進歩は目覚ましい。Cre-loxP システム、tTA-tetO システムなどの時期特異的・グリア細胞種特異的な遺伝子発現制御は十分に成熟してきた。CRISPR/Cas9 による遺伝子編集技術

は、研究に有用な遺伝子改変マウスの供給をさらに高速化させ充実させるであろう。観察に必要な機能分子、操作に必要な機能分子も次々に開発され、それらの機能分子を搭載したマウスが公的バンクに登録されるであろう。

では、観察技術がそれに追いついているだろうか。私を含めた古くからのグリア細胞研究者は、遺伝子改変、細胞培養、生化学実験、薬理学実験、組織・病理学実験が得意で、生理学実験が得意ではない。生きたままのありようを観察することを得意とする生理学実験が苦手なのである。本稿で紹介した *in vivo* 二光子顕微鏡観察、スライス電気生理による精緻な観察は、いずれも高い技術と熟練を必要とする生理学実験である。私はいずれの技術も持ち合わせておらず、共同研究で進めているのが実際のところである。私の研究室ではその代わりに、ファイバーフォトメトリーと呼ばれる光ファイバーを用いた脳深部カルシウム蛍光観察技術²⁵⁾や、マウス機能的 MRI による全脳の活動観察技術²⁶⁾を高めて、グリア研究を推進させようとしている。

培養細胞、スライス、個体と対象が変わるにつれ、操作と観察を合わせた研究を遂行する難易度が上がってくる。しかし操作技術と観察技術の進歩によって、私達グリア研究者が、最難度の *in vivo* 研究を行える時代を迎えている。どんなに複雑な遺伝子配列が組み込まれていたとしても、マウスリソースの提供は簡単である。操作技術の共有も難しくない。しかし、高度専門化した観察技術を提供することは容易ではない。提供したからといってその観察技術が提供先で根付く保証もない。こういった事情を鑑みれば、操作技術の共有に障害があってはならない。操作技術を共有することを前提に、お互いが得意とする観察技術を組み合わせ共同研究を深化させていくのが今後の研究のあり方ではないだろうか。その先に、グリアの機能が見えてくると信じたい。

謝 辞

慶應義塾大学大学院（精神神経科）の1年目に、生理学教室（植村慶一先生）にお世話になったのが神経化学会との出会いでした。以後、神経化学会を国内唯一の活動の場として参りました。本学会の優秀賞を頂けたことは大変有り難いことであり、励みになります。多くの優秀な共同研究者・指導者に恵まれ、研究を続けることが出来ました。感謝いたします。

文 献

- 1) Davalos D, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. *Nat Neurosci*, 8 (6), 752-758 (2005).
- 2) Madisen L, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*, 13 (1), 133-140 (2010).
- 3) Madisen L, et al. A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat Neurosci*, 15 (5), 793-802 (2012).
- 4) Tanaka KF, et al. Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep*, 2 (2), 397-406 (2012).
- 5) Mayford M, et al. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, 274 (5293), 1678-1683 (1996).
- 6) Chuhma N, et al. Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *J Neurosci*, 31 (4), 1183-1192 (2011).
- 7) Inamura N, et al. Gene induction in mature oligodendrocytes with a PLP-tTA mouse line. *Genesis*, 50 (5), 424-428 (2012).
- 8) Tsunematsu T, et al. Optogenetic manipulation of activity and temporally controlled cell-specific ablation reveal a role for MCH neurons in sleep/wake regulation. *J Neurosci*, 34 (20), 6896-6909 (2014).

- 9) Tsunematsu T, et al. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. *Behav Brain Res*, 255, 64-74 (2013).
- 10) Kanemaru K, et al. In vivo visualization of subtle, transient, and local activity of astrocytes using an ultrasensitive Ca(2+) indicator. *Cell Rep*, 8 (1), 311-318 (2014).
- 11) Beard C, et al. Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells. *Genesis*, 44 (1), 23-28 (2006).
- 12) Zeng H, et al. An inducible and reversible mouse genetic rescue system. *PLoS Genet*, 4 (5), e1000069 (2008).
- 13) Egli D, et al. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature*, 447 (7145), 679-685 (2007).
- 14) Premsrirut PK, et al. A rapid and scalable system for studying gene function in mice using conditional RNA interference. *Cell*, 145 (1), 145-158 (2011).
- 15) Carey BW, et al. Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat Methods*, 7 (1), 56-59 (2010).
- 16) Madisen L, et al. Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron*, 85 (5), 942-958 (2015).
- 17) Nimmerjahn A, Mukamel EA, Schnitzer MJ. Motor behavior activates Bergmann glial networks. *Neuron*, 62 (3), 400-412 (2009).
- 18) Takata N, et al. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci*, 31 (49), 18155-18165 (2011).
- 19) Takano T, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci*, 9 (2), 260-267 (2006).
- 20) Petravic J, Boyt KM, McCarthy KD. Astrocyte IP3R2-dependent Ca(2+) signaling is not a major modulator of neuronal pathways governing behavior. *Front Behav Neurosci*, 8 (384), 384 (2014).
- 21) Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD. Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca2+ signaling. *Science*, 327 (5970), 1250-1254 (2010).
- 22) Horikawa K, et al. Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods*, 7 (9), 729-732 (2010).
- 23) Yamazaki Y, et al. Modulatory effects of oligodendrocytes on the conduction velocity of action potentials along axons in the alveus of the rat hippocampal CA1 region. *Neuron Glia Biol*, 3 (4), 325-334 (2007).
- 24) Yamazaki Y, et al. Short- and long-term functional plasticity of white matter induced by oligodendrocyte depolarization in the hippocampus. *Glia*, 62 (8), 1299-1312 (2014).
- 25) Gunaydin LA, et al. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, 157 (7), 1535-1551 (2014).
- 26) Takata N, et al. Optogenetic activation of CA1 pyramidal neurons at the dorsal and ventral hippocampus evokes distinct brain-wide responses revealed by mouse fMRI. *PLoS One*, 10 (3), e0121417 (2015).